

DETECCIÓN DE VIH POR WESTERN BLOT

--6 grupos de estudiantes--

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es comprender la técnica del Western Blot. El desarrollo del kit está enfocado a facilitar a los alumnos el conocimiento de los conceptos y de la metodología necesarios para la aplicación de la técnica del Western Blot. La práctica consiste en la detección de proteínas virales simuladas, obtenidas a partir de cultivos de células infectadas con un hipotético suero de individuos seropositivos al VIH.

2. COMPONENTES SUMINISTRADOS EN EL KIT

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
<u>MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS</u>	
A- Control Positivo	NEVERA
B- Control Negativo	NEVERA
C- Paciente #1	NEVERA
D- Paciente #2	NEVERA
E- Paciente #3	NEVERA
F- Marcador estándar de peso molecular	NEVERA
<u>COMPONENTES PARA LA ELECTROFORESIS</u>	
Agarosa	TEMP. AMBIENTE
Tampón TRIS-Glicina-SDS 10x (LÍQUIDO)	TEMP. AMBIENTE
Tampón TRIS-Glicina-SDS 10x (POLVO)	TEMP. AMBIENTE
Tampón de carga	TEMP. AMBIENTE
Pipeta de 1 ml	TEMP. AMBIENTE
<u>COMPONENTES PARA LA TRANSFERENCIA Y LA TINCIÓN</u>	
6 Membranas de Western Blot (7cm x 7cm)	TEMP. AMBIENTE
6 Papeles de filtro para la transferencia (7cm x 7cm)	TEMP. AMBIENTE
FlashBlue Protein Stain® (POLVO)	TEMP. AMBIENTE

NOTA: ESTE EXPERIMENTO NO CONTIENE NINGÚN MATERIAL PREPARADO A PARTIR DE FUENTES HUMANAS O DE VIRUS.

2.1 Material requerido y no suministrado:

Cubeta de electroforesis.
Fuente de alimentación.
Pipetas automáticas y puntas.
Plataforma de agitación.
Placa calefactora o microondas.
Estufa de incubación (65°C).
Tubos de microcentrifuga.
Cubeta de precipitación.
Pipetas.
Bandeja o recipiente para una membrana de 7x7 cm y 100 ml de líquido.
Guantes desechables.
Envoltorio de plástico.
Tijeras.
Etanol 95 o 100%.
Vinagre Blanco.
Agua destilada.
Regla métrica.
Probetas.
Toallas de papel.

3. INTRODUCCIÓN

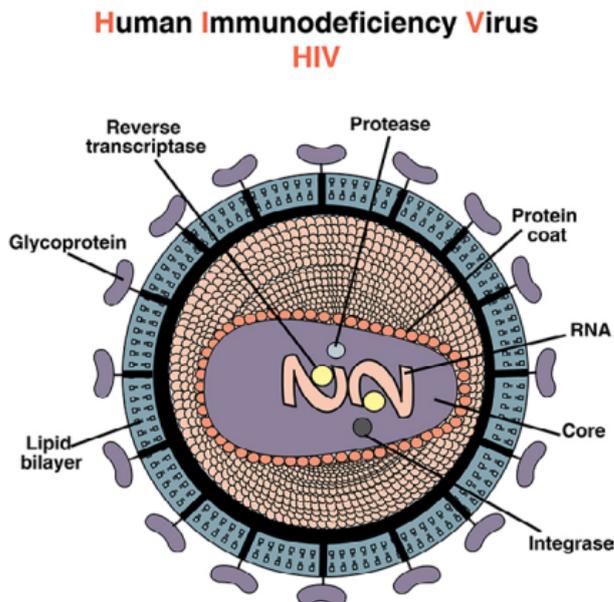
El Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad caracterizada por el deterioro progresivo del sistema inmune de un individuo. El deterioro inmunológico permite que los agentes infecciosos, como virus, bacterias, hongos y parásitos, invadan el cuerpo y se propaguen. Además, la incidencia de ciertos tipos de cáncer aumenta dramáticamente en estos pacientes debido a tener su sistema inmune comprometido. El SIDA es una seria amenaza para la salud humana y es un problema global. La investigación intensiva se está haciendo para avanzar en los métodos de detección, tratamiento clínico y prevención.

El virus del VIH

El agente etiológico del SIDA es el virus de inmunodeficiencia humano tipo 1 (VIH-1), un retrovirus. El VIH-1 contiene un genoma compuesto por ARN y una enzima, DNA-polimerasa dependiente de ARN, denominada transcriptasa inversa. Los miembros de la familia de los retrovirus están involucrados en la patogénesis de ciertos tipos de leucemias y otros sarcomas en seres humanos y animales. La estructura y el mecanismo de replicación del VIH son muy similares a otros retrovirus. El VIH es único en algunas de sus propiedades, ya que actúa específicamente sobre el sistema inmunológico. Es muy inmuno-evasivo y forma cantidades significativas de virus durante las etapas iniciales de la infección. Además, pueden ser transmitidos durante la actividad sexual.

La partícula viral del VIH está rodeada de una bicapa lipídica derivada de la membrana celular del huésped. Las proteínas virales son identificadas por el prefijo GP (glicoproteína) o P (proteína) seguido de un número que indica el peso molecular aproximado, en kilodaltons. La bicapa lipídica contiene gp120 y gp41. Estas dos proteínas son productos proteolíticos de la precursora gp160. La gp41 ancla la gp120 en la bicapa. La proteína gp120 se utiliza habitualmente como un marcador de diagnóstico del VIH mediante el análisis por Western Blot. Más recientemente, también se han incluido otras glicoproteínas virales como marcadores para esta prueba. Debajo de la bicapa hay una cápside formada por p17 y p18. Dentro de esta cápside se encuentra el núcleo del virus.

Las paredes del núcleo están formadas por p24 y p25. Dentro del núcleo hay dos moléculas idénticas de ARN, de 9800 nucleótidos de longitud. Los puentes de hidrógeno que unen las dos moléculas de ARN se forman a partir de una molécula de tRNA celular. El ARN viral está recubierto por moléculas de p7 y p9 fuertemente unidas. El núcleo también contiene, aproximadamente, 50 moléculas de la transcriptasa inversa.



Hay varias proteínas virales cuya función exacta no se comprende totalmente. El virus puede crecer en cultivos de tejidos para el diagnóstico y la investigación. Varias de las proteínas virales han sido clonadas y obtenidas en unas cantidades consideradas como relativamente grandes.

Un individuo puede recibir un inóculo de VIH a través de una abrasión en la mucosa superficial (por ejemplo, de genitales y paredes del recto), una transfusión de sangre, o por inyección intravenosa con una aguja contaminada. Los virus o las células infectadas por virus se encuentran en los fluidos corporales, como el semen y la sangre. El objetivo

más importante para el virus son las células hematopoyéticas, como los monocitos, mielocitos y linfocitos derivados de la médula ósea. La infección de las células efectoras del sistema inmunitario, tales como las células T y los macrófagos, tiene consecuencias clínicas muy importantes. La gp120 se une a los receptores CD4 en la superficie de células T "helper" (TH). Estos receptores son glicoproteínas unidas a la membrana que participan en la activación de células T. En condiciones normales CD4 actúa como un receptor de membrana para el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) uniéndose a moléculas que están presentes en la superficie de los macrófagos y otros tipos de células. Las células TH son necesarias para las respuestas inmunológicas del cuerpo en general. La bicapa lipídica de los virus se fusiona con la de las membranas de las células y la cápside de proteínas virales pasa al interior de la célula por un proceso de endocitosis. Después, la presencia de receptores CD4 disminuye y las gp120 aparecen en la superficie de la célula T. A través de un mecanismo complejo, la transcriptasa inversa sintetiza una copia de ADN de doble cadena a partir del ARN genómico. La molécula de ARNt actúa como cebador de la síntesis de la primera cadena. La actividad ARNasa H de la transcriptasa inversa, degrada la cadena de ARN de la doble cadena ARN-ADN y la enzima sintetiza una hebra de ADN complementario. Las transcripciones inversas de ADN (ADN de doble cadena) migran hacia el núcleo de la célula donde se integran de forma covalente en el ADN genómico celular. La integración es catalizada en parte por las proteínas virales. La copia de ADN se integra mediante una vía específica, las secuencias de auto-conexión en ambos extremos se llaman repeticiones terminales largas (LTR). Estas secuencias también tienen funciones importantes en la transcripción viral. El ADN copiado e integrado se denomina material de ADN o provirus. El provirus entra en un período de latencia que puede durar varios años. El ADN proviral se replica junto con el ADN celular y puede ser heredado a través de muchas generaciones de células. El ADN

proviral del VIH contiene los principales genes no transducidos comunes a todos los retrovirus. Estos genes son gag, pol y env. El VIH-1 también contiene cinco o seis genes más pequeños.

A diferencia de otras ADN polimerasas celulares, la ADN polimerasa del VIH (transcriptasa inversa) tiene una alta tasa de errores. Estas mutaciones frecuentes del ADN, implica un cambio continuo de los epitopos de proteínas virales. Esto, se cree que es el principal mecanismo de inmunoevasión del VIH. El gen gag se traduce a un polipéptido que se escinde por una proteasa viral en cuatro proteínas que forman las capas internas. La proteasa está codificada por el gen pol. El gen pol codifica la transcriptasa inversa y la integrasa, que es responsable de la incorporación genómica de la copia de ADN. El gen env codifica las glicoproteínas de superficie que las partículas virales adquieren a medida que infectan las células. La replicación viral es la causa de la destrucción de las células TH.

La técnica de ELISA es un importante método inmunoquímico utilizado para la detección de antígenos que se encuentran en bajos niveles. El ELISA se utiliza en la detección clínica del VIH en muestras de sangre. La técnica de ELISA para VIH detecta IgG circulantes del paciente dirigidos hacia los antígenos virales. Una reacción positiva en el ELISA requiere de otra prueba para su verificación definitiva, mediante un Western Blot. El motivo de realizar esta prueba de verificación es que los anticuerpos pueden presentar a veces reacciones cruzadas y obtener unos resultados erróneos.

Propiedades de las proteínas

La electroforesis en gel desnaturizante SDS separa las proteínas en función de su tamaño. El SDS (duodecilsulfato de sodio) es un detergente que consiste en una cadena de hidrocarburo unida a un grupo sulfato altamente cargado negativamente. El SDS se une con fuerza a la mayoría de las proteínas y hace que la cadena se desenrolle en forma de varilla, adquiriendo una carga negativa neta. En ausencia de un agente desnaturizante, como el 2-mercaptoetanol, los enlaces no covalentes se rompen en este proceso, aunque la composición de aminoácidos y la secuencia sigue siendo las mismas. Al perder la proteína su forma tridimensional también perderá su actividad biológica.

Las proteínas que han perdido su patrón de plegado específico y su actividad biológica, pero mantienen intactas sus cadenas de polipéptidos se llaman desnaturizadas. Las proteínas que contienen varias cadenas de polipéptidos que tienen enlaces no covalentes son disociadas por el SDS en cadenas polipeptídicas separadas, desnaturizadas. Las proteínas pueden contener enlaces cruzados covalentes conocidos como uniones o puentes de disulfuro. Estos puentes están formados entre dos residuos de aminoácidos de cisteína que pueden estar localizados en la misma o en diferentes cadenas de polipéptidos. El tratamiento de proteínas a 100°C durante 3 minutos en presencia de altas concentraciones de agentes reductores, como el 2-mercaptoetanol, romperá los enlaces disulfuro. Esto permite al SDS disociar la proteína completamente y desnaturizarla.

Durante la electroforesis, las proteínas desnaturizadas con SDS migran a través del gel hacia el electrodo positivo a una velocidad que es inversamente proporcional a su peso molecular. Es decir, cuanto menor es la proteína, más rápido migra en el gel. El peso molecular de una proteína desconocida se obtiene al comparar su posición con respecto a la de las proteínas estándar, desnaturizadas con SDS después de realizar la electroforesis.

Análisis por Western Blot

El análisis por Western Blot implica la transferencia directa de bandas de proteínas a partir de un gel de agarosa o de poliacrilamida a una membrana de nailon

cargada, para su análisis posterior. Después de la electroforesis, el gel se retira de la cubeta y la membrana de nailon se coloca directamente sobre el gel (las membranas de nailon son mucho más fuertes y flexibles que los geles y puede someterse a muchas manipulaciones sin desgarrarse.) Las bandas de proteínas se transfieren a la superficie de la membrana de nailon y se adsorben sobre la membrana por enlaces hidrófobos. Esta transferencia se logra por electroforesis en cámaras especialmente diseñadas, por flujo capilar o por la aplicación de vacío.

La proteína total transferida se puede visualizar con la tinción de la membrana con tintes de proteínas. La visualización de una proteína específica dentro de una mezcla de proteínas se detecta normalmente por métodos inmunológicos. Pero una proteína no puede ser detectada por tinción cuando su cantidad es demasiado baja o si queda encubierta por el resto de las bandas de la mezcla de proteínas o bien por otras proteínas de un peso molecular similar.

Para la detección inmunológica de la proteína específica, se coloca una membrana sin teñir en un tampón de bloqueo, que contiene detergente y proteína que se unen a todos los sitios no ocupados sobre la membrana de nailon. La membrana se incuba después en un tampón que contiene anticuerpos que se unen a una (o más) de las proteínas buscadas.

El anticuerpo se une a la proteína adsorbida (antígeno) y los lavados posteriores eliminan los anticuerpos no unidos. Un anticuerpo secundario que está covalentemente ligado a un enzima, como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, se utiliza para la detección. Las condiciones para unir el enzima y el anticuerpo secundario no afectan la especificidad de unión con el antígeno, la afinidad del anticuerpo, o la actividad catalítica de la enzima.

La membrana se incuba a continuación en una solución de anticuerpo secundario, en donde se unirá selectivamente al complejo antígeno-anticuerpo primario. Después de este tratamiento, la membrana se lava para eliminar el complejo anticuerpo secundario-enzima no unido y se incubará en una solución que contiene un sustrato de fosfatasa o peroxidasa. Los productos obtenidos de la reacción enzimática son productos cromogénicos, fácilmente visibles sobre la membrana de nailon.

En esta práctica, los estudiantes utilizarán un análisis por Western Blot modificado para detectar una proteína del HIV

4. PREPARACIÓN DE LA PRÁCTICA

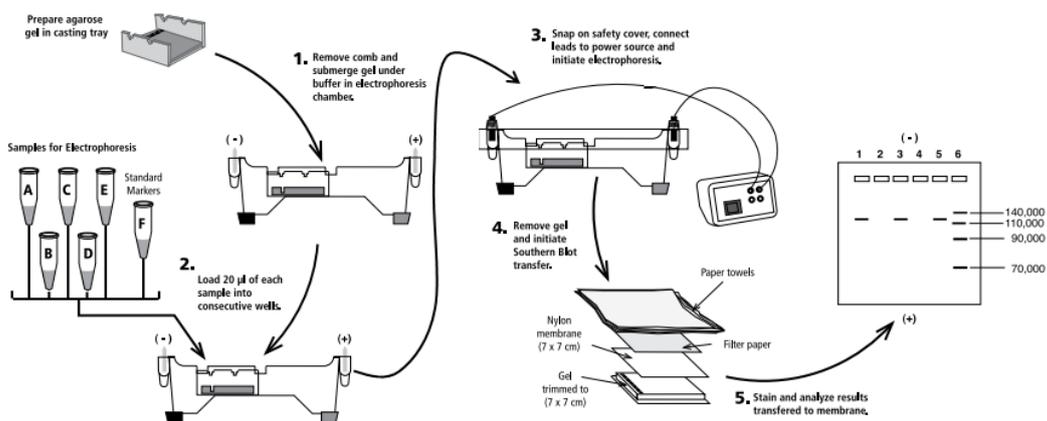
El objetivo de este experimento es entender los conceptos y metodología involucrados en la técnica de Western Blot. En el desarrollo del experimento se detectará la presencia de proteínas virales simuladas, obtenidas a partir de cultivos de células infectadas con un hipotético suero de individuos seropositivos para VIH.

NOTA: ESTE EXPERIMENTO NO CONTIENE NINGÚN MATERIAL PREPARADO A PARTIR DE FUENTES HUMANAS O DE VIRUS.

4.1 Precauciones:

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.
2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y/o mezcla de reactivos.
4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.
5. Tenga cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.

RESUMEN ESQUEMÁTICO DE LA PRÁCTICA



MÓDULO I: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PARA PROTEÍNAS

NOTA: Al preparar el gel de agarosa al 2,5%, **asegurarse de utilizar el tampón Tris-glicina 1x** preparado por el profesor. Tened cuidado de **NO UTILIZAR el tampón Tris-glicina-SDS 1x**

PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA AL 2,5% PARA PROTEÍNAS

1. Determinar la cantidad de agarosa necesaria según el tamaño del gel, atendiendo a las indicaciones de la Tabla A (se recomienda hacer geles del tamaño 7cm x 7 cm).

Size of Gel Casting tray	Amt of Agarose	+ Volume 1X Tris-glycine Buffer	= TOTAL Volume
7 x 7 cm	0.6 g	29.4 mL	30 mL
14 x 7 cm	1.2 g	58.8 mL	60 mL

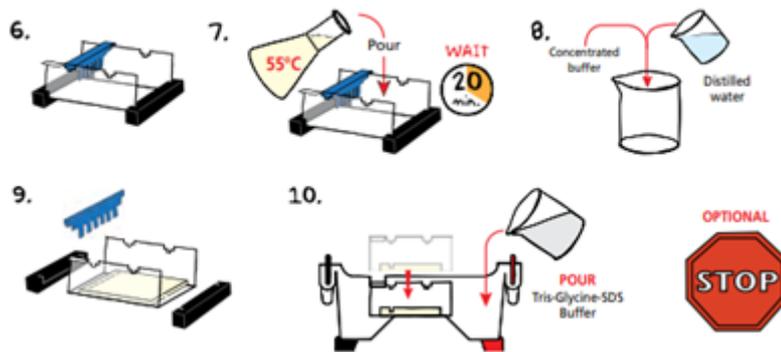
2. Añadir la cantidad de agarosa necesaria al recipiente que contiene el tampón Tris-Glicina. Agitar suavemente el recipiente para dispersar los grumos de agarosa.

3. Con un marcador, indicar con una línea el nivel del volumen de la solución preparada en el exterior del recipiente.

4. Disolver la agarosa calentando la solución:

A)	Poner la solución de agarosa en el microondas durante 1 minuto.
B)	Retirar el frasco del microondas y agitar suavemente para homogeneizar la solución.
C)	Continuar calentando la solución durante 15 segundos, aproximadamente, hasta que la agarosa esté completamente disuelta (la solución debe tener un color similar al agua). Volver a repetir este paso si es necesario.
D)	Retirar la solución del microondas.
E)	Observar si ha habido evaporación. Si es el caso, añadir agua destilada hasta que la solución alcance el nivel que hemos marcado en el recipiente.
F)	Homogeneizar la solución agitando el recipiente, suavemente, en pequeños círculos

5. Enfriar la agarosa hasta unos 55 °C haciendo girar el recipiente suavemente hasta conseguir que se disipe el calor. Si se ha detectado una evaporación en el recipiente, añadir agua destilada hasta alcanzar el volumen marcado en el recipiente y agitar suavemente para homogeneizar la solución.



6. Mientras la agarosa se enfría, selle los extremos de una bandeja de gelificación con las tapas de goma. Coloque la plantilla de pocillos (peine) en el primer conjunto de muescas. **Nota:** Recomendable los geles de 7cm x7cm.

7. Vierta lentamente la solución de agarosa enfriada en la bandeja de gel preparada.

8. Mientras se solidifica la agarosa, preparar el tampón de la cámara de electroforesis, siguiendo las indicaciones de la Tabla B.

9. Una vez que el gel se ha solidificado, Retirar ambas tapas de los extremos y luego retirar el peine tirando hacia arriba.

Nota: Trabaje lenta y cuidadosamente para evitar dañar los pocillos.

Table B 1x Tris-Glycine-SDS (Chamber) Buffer			
EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Dilution Conc. Buffer + Distilled Water	
M12	400 mL	40 mL	360 mL
M36	1000 mL	100 mL	900 mL

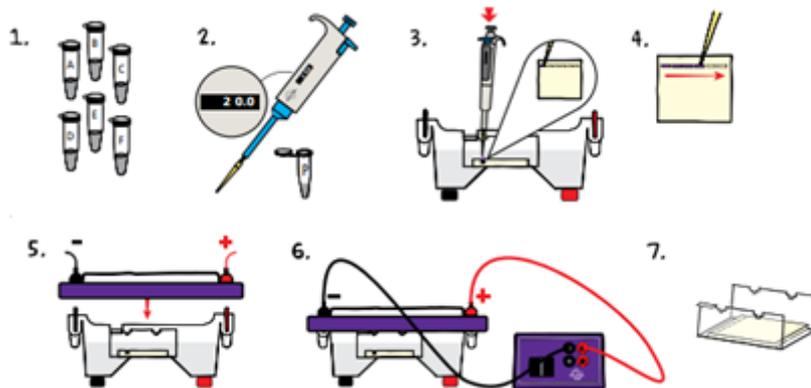
10. Coloque el gel (aún en la bandeja) en la cámara de electroforesis. Cubra el gel con el tampón de electroforesis preparado según las indicaciones de la Tabla B, utilizando el volumen recomendado. El gel debe quedar completamente sumergido.



Punto de parada opcional:

Los geles pueden conservarse durante la noche, sumergidos en la cámara de electroforesis. Los geles también pueden almacenarse durante algunos días en la nevera. Mantenga hidratados los geles refrigerados, guardando cada gel en una bolsa de plástico hermética que contenga una pequeña cantidad de tampón de electroforesis.

ELECTROFORESIS



1. Recoja las muestras rehidratadas y calentadas (A-E), y el marcador de proteína estándar (F) proporcionado por su profesor. **NOTA:** Cargar las muestras mientras aún estén calientes.

2. Utilizando una punta de pipeta nueva, coger 20 µL de la primera muestra.

3. Colocar la punta de la pipeta debajo del tampón y directamente sobre el pocillo de muestra. Dispense lentamente la muestra presionando el émbolo.

4. Repetir los pasos 2-4 con el resto de muestras.

5. Colocar la tapa de seguridad de la cámara. Compruebe que el gel esté correctamente orientado. Recuerde que las muestras migrarán hacia el electrodo positivo (rojo).

6. Conectar los cables a la fuente de alimentación para iniciar la electroforesis (consultar la Tabla C para conocer las pautas de tiempo y voltaje). Continuar con la electroforesis hasta que el tinte azul de seguimiento haya recorrido al menos 4-4,5 cm desde los pocillos.

NOTA: Para optimizar el tiempo del laboratorio, los estudiantes deben comenzar a configurar su Western blot (Módulo II, pasos 1 a 5) durante la electroforesis.

Lane	Tube	Sample
Lane 1	Tube A	Positive control
Lane 2	Tube B	Negative control
Lane 3	Tube C	Patient 1
Lane 4	Tube D	Patient 2
Lane 5	Tube E	Patient 3
Lane 6	Tube F	Standard Molecular Weight Dye Markers

Volts	Recommended Time	
	Minimum	Maximum
150	20	45
125	25	55
100	30	60

7. Una vez finalizada la electroforesis, retirar el gel y la bandeja de la cámara de electroforesis y proceder inmediatamente al análisis mediante el Western blot.

MÓDULO II: WESTERN BLOT (TRANSFERENCIA POR CAPILARIDAD)

Configuración del Western Blot:

NOTA: La membrana de Western Blot **SOLO** se puede manipular con guantes de laboratorio prelavados, después de tenerlos colocados. Las manos dejan residuos grasos que interfieren en el proceso de adhesión de las proteínas a las membranas, impidiendo que la práctica se realice correctamente.

Algunos guantes contiene polvos que impiden la adhesión de las proteínas a las membranas. Para eliminar el polvo, póngase los guantes y lávelos con agua del grifo.

1. Colocar un trozo de film plástico sobre la mesa de trabajo. Asegúrese de que esté liso y plano. Si es necesario, pegue con cinta adhesiva los cuatro bordes para que el film quede bien ajustado y seguro. (El papel de filtro, el gel, la membrana y las toallas de papel se colocarán encima para formar las diferentes capas).
2. Retirar con cuidado las hojas azules que cubren la membrana blanca de Western blot. Con unas pinzas, transfiera la membrana a una bandeja de plástico.
3. Humedecer la membrana sumergiéndola en aproximadamente 20 ml de etanol (95% - 100%) durante 10 segundos. Decantar el etanol y guardarlo.
4. Sumergir inmediatamente la membrana en agua destilada durante unos 5 minutos para eliminar el etanol.
5. Escurrir el agua y sumergir la membrana en **el tampón de transferencia diluido**. Dejar reposar la membrana hasta que se necesite (para realizar la transferencia de proteínas desde el gel), al menos durante 10 minutos.
6. Retirar el gel de la bandeja y sumergirlo en una bandeja separada (**contiene el tampón de transferencia**). Dejarlo sumergido durante 10 a 15 minutos.
7. Saturar 1 trozo de papel de filtro (7 cm x 7 cm) con tampón de transferencia (sumergiéndolo). Colocar el papel de filtro sobre el film de plástico.
8. Retirar con cuidado el gel del tampón de transferencia y colocarlo boca abajo sobre el papel de filtro. Pase una pipeta (deslizándola) sobre la superficie para eliminar las burbujas de aire que puedan quedar atrapadas bajo el gel.
9. Pipetear de 1 a 2 ml de tampón de transferencia y depositarlo sobre el gel y después coloque la membrana de Western blot sobre él. **NOTA: Si la membrana presenta una superficie lisa en un lado y rugosa en el otro, asegúrese de que esta última (cara rugosa) esté en contacto directo con el gel. Deslizar una pipeta sobre la superficie para eliminar las burbujas de aire.**

10. Utilice un lápiz para trazar suavemente la ubicación de cada banda en el carril 6. Junto a cada marca, indique el color de la banda correspondiente (B1 = Azul 1, B2 = Azul 2, P = Morado y R = Rojo). **NOTA:** El marcador de proteínas utilizado en este experimento es un colorante que no se transfiere a la membrana, por lo que debe identificarse sobre la membrana de transferencia antes de secarla.
11. Saturar un trozo de papel de filtro con tampón de transferencia y cubrir la membrana con el papel de filtro húmedo. Deslizar una pipeta sobre la superficie para eliminar las burbujas de aire.
12. Añadir el segundo trozo de papel de filtro seco a la parte superior de la pila. Eliminar las burbujas de aire.
13. Colocar uniformemente una pila de papel (de tamaño 7cm x 7 cm) hasta formar unos 4 cm - 6 cm de grosor.
14. Colocar una bandeja o plato de plástico sobre la pila. Coloque un vaso de precipitados ligero (de 400 ml) encima.
15. Dejar que la transferencia de proteínas continúe durante la noche o durante un mínimo de 4 horas.

PROCESAMIENTO DE LA MEMBRANA DE TRANSFERENCIA

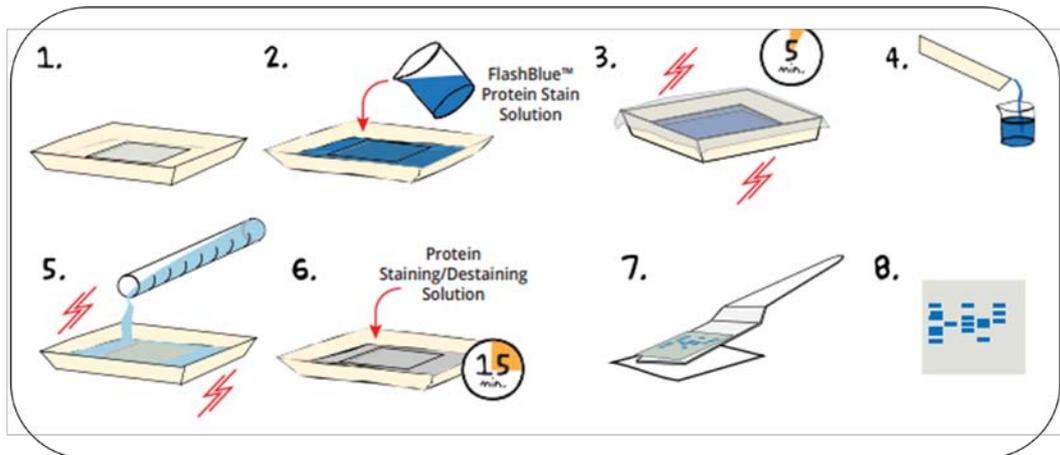
1. Retirar la bandeja, la pila de papel y el papel de filtro de la parte superior de la membrana. Dejar la membrana en su lugar encima del gel.
 2. Con un lápiz, trazar suavemente el contorno de cada pocillo. Identificarlo según la secuencia de carga. (recuerda que el gel está al revés).
 3. Con unas pinzas, retirar la membrana del gel y colocarla sobre un papel de filtro limpio. **El lado que estuvo en contacto con el gel debe quedar hacia arriba.**
 4. Con un lápiz, en una de las esquinas inferiores escribe "F" (de frontal). En la otra esquina, escribe tu número de grupo o tus iniciales.
 5. Colocar la membrana en un horno de incubación (65 °C) durante 10 minutos para fijar las muestras.
-



Punto de parada opcional:

Después de que la membrana ha sido fijada, la membrana se puede mantener durante algunos días, antes de la tinción.

TINCIÓN DE LA MEMBRANA DE TRANSFERENCIA



1. Colocar la membrana en un recipiente poco profundo, con la cara frontal etiquetada hacia arriba.

2. Añadir 30 ml de FlashBlue™ (colorante de proteínas). La membrana de transferencia **DEBE** estar cubierta de líquido en su totalidad.

3. Incubar la membrana durante 5 minutos a temperatura ambiente, agitando suavemente de vez en cuando (cada minuto, por ejemplo).

4. Descartar la solución FlashBlue™.

5. Lavar la membrana llenando parcialmente el recipiente con agua destilada, agitando suavemente varias veces. Deseche el agua usada y repita el proceso una o dos veces con agua destilada.

6. Añadir 30 ml de Solución Decolorante de proteínas a la membrana e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Examinar la membrana. Si desea mayor contraste entre el fondo y las bandas coloreadas, deseche la Solución Decolorante de proteínas usada y añada 30 ml adicionales de Solución Decolorante de proteínas. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente para mejorar la apariencia y el contraste de las bandas de proteínas coloreadas con el fondo.

7. Retirar la membrana de transferencia de la Solución Decolorante y colocarla sobre un trozo de papel de filtro.

8. Comparar las tres muestras de los pacientes con los controles positivo y negativo.

RECUERDE:

La prueba de diagnóstico de HIV/AIDS establece la presencia de la proteína de la cubierta viral gp120 mediante la interacción con el anticuerpo y también confirma el tamaño de la banda de proteína de 120000 daltons \pm 10%

MÓDULO III: ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA PROTEÍNA VIRAL SIMULADA gp120

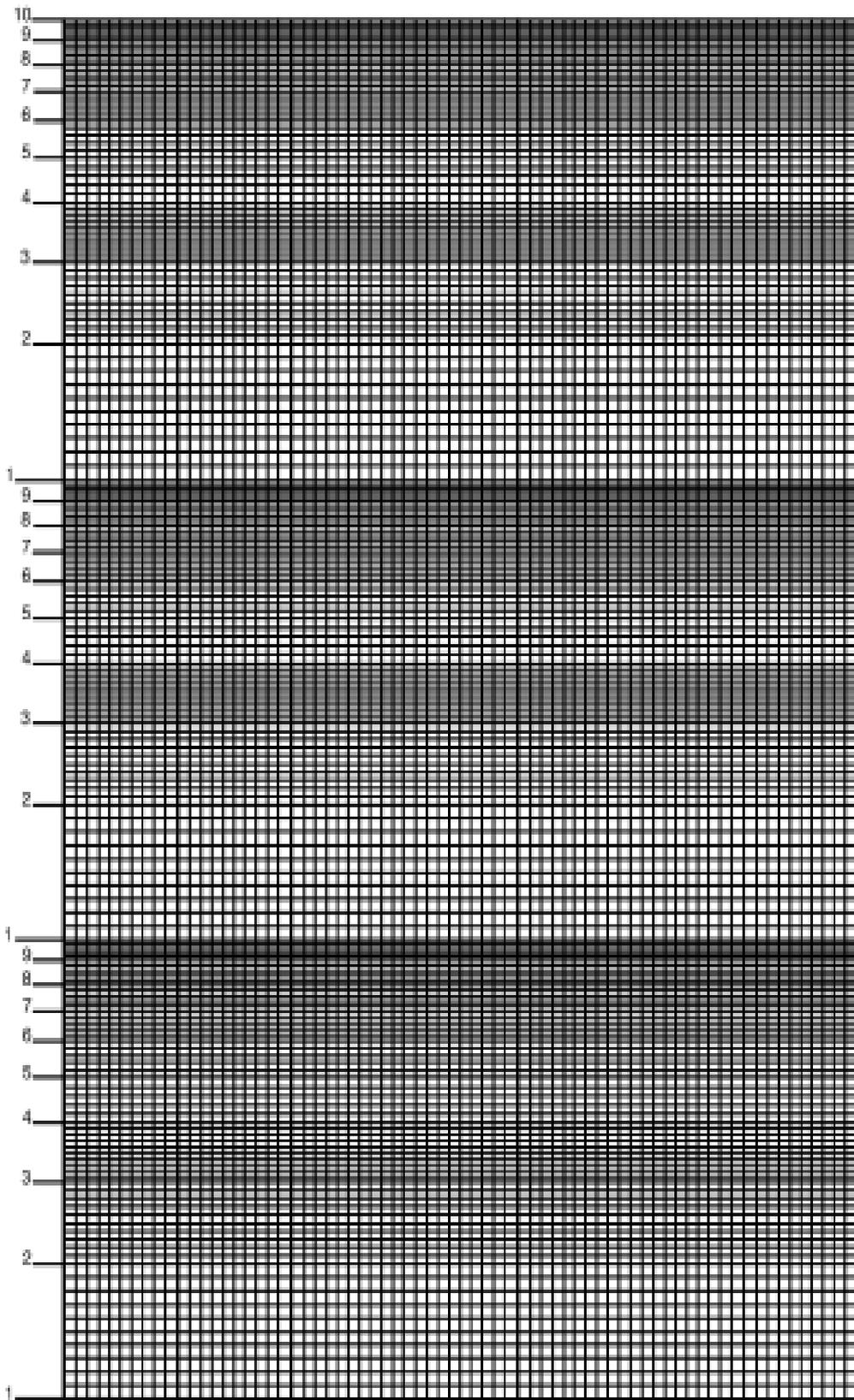
1. Medir la distancia de cada banda trazada en los marcadores de tinción estándar y las muestras virales positivas. Cada medición debe realizarse desde el final del pocillo hasta el final de cada banda marcada.

Los tamaños para los marcadores estándar son (en daltons):

Azul 1	140000
Azul 2	110000
Púrpura	90000
Rojo	70000

2. Utilizar papel semilogarítmico y dibujar las distancias recorridas para cada banda en el eje de las X. Dibujar el peso molecular correspondiente en el eje de las Y.

3. Determinar el peso molecular de la proteína viral mediante la extrapolación de la curva estándar.



CUESTIONES A RESOLVER

1. ¿Por qué las proteínas fraccionadas electroforéticamente se transfieren a una membrana para su detección?
2. ¿Un mayor o menor porcentaje de agarosa en los geles favorecería la transferencia a una membrana? ¿Se transferirían mejor las proteínas más grandes o las más pequeñas?
3. ¿Cuál es el propósito de los controles negativos y positivos?
4. ¿Cuál es la diferencia entre un Western Blot, un Northern Blot y un Southern Blot?

GUÍA DEL PROFESOR

ORGANIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE LA PRÁCTICA

Antes de comenzar la práctica, revise cuidadosamente la lista de componentes y requisitos (páginas 1 y 2) para asegurarse de tener todos los componentes y equipos necesarios.

Este kit incluye reactivos para seis grupos.

	Acciones	Realización	Tiempo
<i>MÓDULO I</i>	Distribuir el material para los estudiantes	Antes del Módulo I	10 minutos
	Preparar los geles y los tampones de electroforesis.	Como máximo una semana antes de iniciar el Módulo I	30 minutos
<i>MÓDULO II</i>	Rehidratar la muestras de proteína	Como máximo una semana antes de iniciar el Módulo II	10 minutos
<i>MÓDULO III</i>	Preparar las soluciones de tinción	Como máximo una semana antes de iniciar el Módulo III	10 minutos

PREPARACIONES PREVIAS

Preparación de las membranas de electroforesis

Recuerde **usar** guantes de laboratorio limpios y secos para manipular membranas de Western blot (Lavar los guantes una vez colocados). La grasa de las manos o el polvo de los guantes interferirán con el procedimiento y pueden alterar el resultado.

Proteja las membranas de transferencia del Western manteniéndolas entre las dos hojas de cubierta azules, hasta el que las necesite en el paso 2 del Módulo II.

Para este experimento se proporcionan seis membranas de transferencia para Western blot, precortadas a 7 cm x 7 cm y seis papeles de filtro para la transferencia, precortados también a 7 cm x 7 cm.

Si trabaja con geles de electroforesis más pequeños, deberá ajustar el tamaño de las membranas, los papeles de filtro de la transferencia y la pila de papeles, al tamaño exacto del gel para garantizar una transferencia óptima.

Preparación de tampones (en el día de su uso)

Preparación del tampón de Tris-Glicina (se usa en la fabricación del gel)

1. Agregar **el tampón de Tris-Glicina (POLVO)** al matraz o vaso de precipitados (de tamaño superior a 500 ml).
2. Añadir 300 ml de agua destilada o desionizada al tampón Tris-Glicina en polvo. Agitar y remover para disolver el polvo de Tris-Glicina (mejor si dispone de un agitador). **Este tampón es el tampón 1x para usar en la preparación de los geles.**

OPCIONAL. Para ahorrar tiempo, puede preparar los geles siguiendo las instrucciones del kit en las páginas 7 y 8. **NOTA: Es aconsejable que los geles sean del tamaño 7 cm x 7 cm.**

Preparación del tampón de Transferencia (requerido para el día 1)

1. Poner 350 ml de agua destilada en un vaso de precipitados. **Añadir 50 ml del tampón Tris-Glicina-SDS 10x (LÍQUIDO)**.
2. Añadir 100 ml de etanol (95% - 100%). Mezclar. Mantener bien tapado a temperatura ambiente hasta su uso.

Preparación del tampón de Electroforesis (Tampón Tris-Glicina-SDS)

1. Añadir **1 parte del tampón Tris-Glicina-SDS 10x (LÍQUIDO)** a 9 partes de agua destilada o agua desionizada. **Este es el tampón que se debe de utilizar en la realización de la electroforesis.**
2. Preparar suficiente tampón 1x para todas las unidades de electroforesis que se van a utilizar. El volumen aproximado de **tampón de electroforesis 1x** necesario para las cámaras de electroforesis horizontales (de la marca Edvotek) se indica en la tabla B del módulo I. Si se dispone de una cámara de electroforesis de otra marca, seguir las instrucciones del fabricante.

Preparación de las muestras de proteína liofilizadas (en el día de su uso)

1. Añadir 130 µl de agua destilada o agua desionizada a cada tubo (A-E). Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos. Agitar en vórtex o mezclar vigorosamente.
2. Poner a hervir un vaso de agua cubierto con papel aluminio. Retirar del fuego.
3. Asegúrese de que los tubos de las muestras (A – E) estén bien tapados y bien etiquetados. Introduzca la base de los tubos a través del papel de aluminio y sumérjalos en agua hirviendo durante 5 minutos. Los tubos deben mantenerse suspendidos por el papel de aluminio.

NOTA: No hierva los marcadores de peso molecular estándar (componente F)

4. Retirar los tubos de muestras y centrifugarlos para que el volumen líquido quede en la parte inferior del tubo.
5. Alicuotar 20 µL de cada muestra más los marcadores estándar (componente F) para cada grupo. Es importante que los estudiantes carguen las muestras en el gel mientras las muestras (A-E) todavía están calientes.

Tinción de la membrana de Transferencia

Preparación de las Soluciones de Tinción

1. Preparar una solución madre de vinagre blanco y etanol (* **Ver nota al margen**) mezclando 400 ml de vinagre blanco con 200 ml de etanol. Mezcle suavemente. Etiquete la solución como "Solución Decolorante".
2. Añadir 100 ml de la Solución Decolorante a la botella de FlashBlue™. Agitar suavemente para mezclar. Verter en un recipiente o botella nueva y añadir 80 ml adicionales de la Solución Decolorante. Agitar o remover suavemente para mezclar.
3. Almacenar ambas soluciones a temperatura ambiente hasta su uso.
4. Alicuotar 60 mL de la Solución Decolorante y 30 mL de la Solución FlashBlue™ para cada grupo de estudiantes.

* **Nota al margen:** El vinagre blanco, a veces llamado vinagre destilado o de alcohol, es un vinagre fácil de encontrar para cocinar y limpiar, con una concentración de ácido acético de entre el 5 % y el 8 % y un pH de 2,6. El etanol es un producto de laboratorio común, disponible en diversas concentraciones. Nuestro FlashBlue™ está diseñado para funcionar con una amplia gama de vinagres blancos. Sin embargo, recomendamos usar etanol al 95 % o superior.

CÓMO EVITAR ERRORES COMUNES

Posibles errores y/o problemas que se pueden evitar siguiendo las sugerencias y recordatorios que se enumeran a continuación.

- Para garantizar que las bandas de proteína se resuelvan correctamente, asegúrese de que la formulación del gel sea correcta y de que se vierta rápidamente, ya que los geles con alto porcentaje de proteína pueden enfriarse rápidamente y fraguar de forma desigual. Si esto ocurre, puede volver a fundir el gel.
- Diluya correctamente el tampón concentrado para preparar tanto el gel como el tampón de electroforesis. Recuerde que sin tampón en el gel, no habrá movilidad de las proteínas. Utilice únicamente agua destilada o desionizada para preparar los tampones. **No utilice agua del grifo.**
- Para obtener resultados óptimos, utilice un tampón de electroforesis nuevo y una solución de tinción nueva, preparados según las instrucciones.
- Este kit de experimentación contiene una solución de carga del gel para practicar. Si no está familiarizado con la electroforesis en gel, le recomendamos que practique la carga de los pocillos de muestra antes de realizar el experimento.
- Para evitar la pérdida de las bandas de proteína en el tampón, asegúrese de que el gel esté correctamente orientado para que las muestras no se migren en la dirección opuesta.
- El marcador de proteínas utilizado en este experimento es un colorante que no se transfiere a la membrana. Por lo tanto, **debe identificarse sobre la membrana antes de secarse.**

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

MÓDULO I

Los resultados que se obtienen en el gel después de la electroforesis deben ser los que se indican en la figura.



MÓDULO II

Las muestras que contienen la proteína simulada del VIH y el control positivo deben presentar una banda de proteína.

El control positivo, los pacientes 1 y 3 presentan bandas.

El control negativo y el paciente 2 no deben presentar bandas visibles.

LÍNEA	MARCA	MUESTRA	PM (daltons)
1	A	Control Positivo	120000
2	B	Control Negativo	---
3	C	Paciente #1	120000
4	D	Paciente #2	---
5	E	Paciente #3	120000
6	F	Marcadores de peso molecular:	
		Azul 1	140000
		Azul 2	110000
		Púrpura	90000
		Rojo	70000

